

02.03.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 3月 2日

RECD 25 APR 2000

PCT

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第054708号

出願人
Applicant(s):

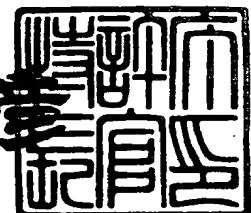
株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆



出証番号 出証特2000-3023211

【書類名】 特許願

【整理番号】 SEN-102

【提出日】 平成11年 3月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 27/447

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区東有馬一丁目3番16号

【氏名】 軽部 征夫

【特許出願人】

【識別番号】 598155287

【氏名又は名称】 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9816211

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 二次元分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 二次元分離による物質の分離方法であって、二次元目の分離のための分離媒体が相互に独立した複数の分離媒体で構成されていることを特徴とする分離方法。

【請求項2】 分離媒体が、平板状の支持体に並んだ物理的に隔てられた複数の空間に充填されている請求項1の分離方法。

【請求項3】 分離すべき物質がタンパク質である、請求項1の分離方法。

【請求項4】 分離が電気泳動によって行われる請求項1の分離方法。

【請求項5】 以下の要素で構成される二次元分離装置。

- a) 一次元目の分離媒体を二次元目の分離媒体と接触した状態に保持する手段
- b) 相互に独立した複数の分離媒体で構成される二次元目の分離媒体、および
- c) 二次元目の分離のための駆動力を供給する手段

【請求項6】 相互に独立した複数の分離媒体が、平板状の支持体に並んだ物理的に隔てられた複数の空間に充填されている請求項5の二次元分離装置。

【請求項7】 二次元目の分離のための駆動力を供給する手段が、分離媒体に電圧を印加する電源である請求項5の二次元分離装置。

【請求項8】 相互に独立した複数の分離媒体で構成される二次元分離用媒体

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、媒体中における物質の移動度の違いに基づく分離技術に関する。より具体的には、性格の異なった2つの駆動力を組み合わせて混合物を二次元に展開し、その座標情報に基づいて物質の分離や同定を行うための技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

媒体中における物質の移動度の違いは、古くから物質の分離や同定に利用され

ている。たとえば、電場に置かれた物質の移動度の違いに基づく電気泳動分析は、物質の性状決定のための手法として広く利用されている。電気泳動分析は、寒天やポリアクリルアミドなどのゲルを媒体とし、このゲル自身が持つ分子ふるい効果と、ゲルを膨潤させている液体に印加された電圧を駆動力とする物質の移動現象を組み合わせた分析方法である。ゲルの密度を調整すれば、同じ駆動力を与えた場合でも物質の移動しやすさが変化する。一方、電圧によって得られる駆動力は物質の荷電状態に左右されることから、物質の荷電状態を調整することにより、物質の挙動を変えることができる。たとえばタンパク質の電気泳動分析において、ドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDSと省略する）のようなタンパク質変性剤の存在下で電気泳動を実施すると、タンパク質分子の荷電状態がその構造とは無関係に強制的に等しくなるので、原則として移動度は分子量を反映したものとなる。あるいはまた等電点電気泳動では、pH勾配の中でタンパク質がその分子の全電荷が0となるpHに収束する現象を利用している。

【0003】

このようにして、さまざまな媒体と、駆動力の組み合わせが利用され、タンパク質をはじめとする多くの物質の分離方法が報告された。しかし1回の分離では単一の原理に基づく分離しか行うことができないので、解像度の向上に関しては常に限界を伴うものであった。たとえば、分子量の違いに基づく分離においては、分子量の接近した分子同士を相互に分離することは原理的に言ってたいへん困難であることは容易に理解できる。そこで、異なった駆動原理を組み合わせた二次元電気泳動が考え出された。二次元電気泳動では、物質の2つの側面から分離が行われるので、解像度の大幅な向上を期待することができる。二次元電気泳動では、たとえばあらかじめ等電点に基づく電気泳動を行った後に、更に異なる媒体上において分子量に基づく電気泳動を実施する(O'Farrell, P.H., J.Biol.Chem. 250, 4007-21.1975)。物質は結果的に等電点と分子量という2つの性状に基づいて二次元に展開されるために、同じ分子量を持つ物質であっても、等電点が異なっていれば違う座標に展開される。つまりX軸方向を等電点、Y軸方向を分子量とする、二次元の座標に各物質がスポットとして分離できる。二次元電気泳動は、その優れた解像度のために、特にタンパク質の分離手法として高い評価を得

ている。

【0004】

さて、ゲノムプロジェクトのような大規模な遺伝子情報の解析プロジェクトの進行に伴い、膨大な遺伝子情報が明らかにされつつある。今後は、このようにして明らかにされた遺伝子情報と、細胞内で複雑に相互作用している多様なタンパク質との関連を明らかにすることによって、遺伝子の機能解析を進めていくことが大きな課題となる。プロテオームという、PROTEin と genOMEを組み合わせた造語で表現される新たな概念が提唱されている(Kahn, P. Science 270, 369-70. 1995)。プロテオーム解析は、細胞の機能を支える多様なタンパク質の関係を総合的にとらえようとする試みである。しかし現在の分析技術では、遺伝子に比べてタンパク質の解析には多大な時間と労力が必要とされている。細胞を構成するタンパク質は5000-7000とも言われている。このように多様性に富むタンパク質の集合であるプロテオームの変化を、総合的に、しかも迅速に把握することが求められているのである。

【0005】

この目的を達成するために、タンパク質の二次元電気泳動は重要な役割を担っている。二次元電気泳動によって得ることができる展開パターンと、同定されたタンパク質の情報を対応させたデータベースは、いわばタンパク質のカタログとしての意味を持っている。正常な状態にある細胞についてタンパク質のカタログがあれば、その細胞の変化をタンパク質の二次元電気泳動による泳動パターンの変化として捉えることができる。変化を起こした細胞の泳動パターンで特異的に現れたり、あるいは消失するスポットが観察されれば、そのタンパク質の機能を推定する上できわめて重要な情報を得ることができる。そしてこの種の情報は、細胞の機能とそれを支えるタンパク質との関連を見出す上で重要なばかりではなく、医薬品開発や、植物や動物の遺伝子育種といったバイオインダストリーの幅広い分野においても大きな成果をもたらす可能性を秘めている。

【0006】

ところで現在行われているタンパク質の二次元電気泳動は、一般的には以下のように進められている。まず、キャピラリーゲルや市販のストリップゲルなどを

分離媒体として等電点電気泳動（一次元目の分離）を行う。一次元目の泳動を終了したゲルは、二次元目の泳動のために第2のゲルに乗せる。第2のゲルは、一次元目の展開方向に対して直角の方向に泳動しなければならぬので、平面状のゲル(slab gel)を用いる。一次元目を等電点電気泳動とした場合、二次元目の電気泳動はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動（以下、SDS-PAGEと省略する）を選択するのが一般的である。この組み合わせにより、一次元方向には等電点(pI)に基づく分離が行われ、二次元方向には分子量に基づいて展開されることになる。

以上のような方法に基づいて、既に多くのプロテオームについて二次元電気泳動が行われている。分離されたタンパク質のスポットについて、アミノ酸配列の決定やペプチドマス・フィンガープリント法による解析結果が座標情報とともに記録される。そしてその情報はSWISS-2DPAGE(<http://expasy.hcuge.ch/ch2d/>)などのデータベースに蓄積されている。

【0007】

公知の二次元電気泳動は、解像度に優れた分離手法ではあるが、スラブゲルを利用せざるを得ないために重大な課題を伴う。二次元目の泳動にはSDS-PAGEが一般的であることは既に述べたとおりである。しかしポリアクリルアミドゲルの調製にあたり、広い面積にわたって均一な品質を維持することは困難である。ゲルの不均一性は移動度の差となって現れる。したがって、たとえ同じタンパク質であっても、ゲルの中央付近と周辺部とでは異なった移動度を示すことは避けられない現象とされている。このような現象はスマイリング(smiling)と呼ばれ、電気泳動像の歪みの原因となっている。電気泳動像の歪みは、座標情報の誤差につながるため、二次元電気泳動の再現性に影響を与える重要な要因となる。特に、解像度を高めることを目的としてしばしば面積の大きなスラブゲルが用いられる。しかしひるの面積が大きければ大きいほど電気泳動像の歪みの影響が大きくなるため、電気泳動には厳しい品質管理が求められることになる。

現実には、注意深く条件を整えた実験結果であっても、異なる電気泳動分析結果の比較は常に電気泳動像の歪みの影響を受けるていると言うことができる。そのため、接近する座標情報を識別することができなかつたり、あるいは隣接するスポットからのタンパク質の分離に十分な再現性を期待できないといったような

問題が生じている。言いかえれば、公知の二次元電気泳動分析においては、電気泳動像の歪みを小さくして再現性を高めることが課題として求められていた。分離結果の解析を機械的に行うためのソフトウェアも開発されているが、再現性を高めるには高度な画像処理技術による泳動像の歪みの補正が必要である。

【0008】

必ずしもゲルを必要としない方法として、キャピラリー電気泳動（以下、CEと省略する）が公知である。CEでは、内径 $100\mu\text{m}$ 程度の細い空間内で電気泳動を行うことから、電気泳動に伴って発生するジュール熱による対流の影響を無視しうる。そのためゲルではなく、液体中での電気泳動も可能である。しかしCEでは内径がわずか数十～ $100\mu\text{m}$ 程度のキャピラリー内で電気泳動を行わなければならぬので、数cm～数十cmにおよぶ幅を必要とする二次元電気泳動に応用することはできない。逆にCEではキャピラリーの一部で電気泳動された物質を採取することが可能という特徴がある。この特徴により、CEでは物質の分離が容易となる。一方スラブゲルにおいては、たとえば電気泳動の結果分離されるスポットから物質を単離するには、目的とするスポットから更に電気的な分離を行うか、あるいはゲルを物理的に切り取るといった操作が求められる。このような操作は操作としても煩雑であるし、何よりも再現性に関して改善の余地を残していた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、二次元電気泳動のような二次元平面における物質の移動を利用した分離方法において、公知の方法では達成することのできなかった高い再現性を、より安価に、かつ簡便な操作で実現することができる新規な分離手法の提供を課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、二次元電気泳動における再現性の向上を妨げる要因として、二次元目の泳動を利用するゲルの不均一性に着目した。ゲルの均質性を大きな面積で保証することは、非常に困難である。したがって、ゲルを平面として供給しなければならない二次元電気泳動は、ゲルの均質性によって常に再現性を大きく左

右されてしまうことになる。

そこで本発明者らは、平面ではなく、幅の狭いゲルを二次元目のゲルとして利用することにより、ゲルの不均一性の問題を回避できるのではないかと考えた。

しかし、二次元電気泳動の原理上、二次元目の泳動には一次元目の電気泳動距離をある程度カバーするだけの幅が必要である。幅の狭いゲルでは、このような要求を満たすことはできない。本発明者らは、この課題を相互に独立した複数のゲルを並列させて利用することによって解決し、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の二次元分離方法、ならびにそのための装置に関する。

【0011】

〔1〕二次元分離による物質の分離方法であって、二次元目の分離のための分離媒体が相互に独立した複数の分離媒体で構成されていることを特徴とする分離方法。

〔2〕分離媒体が、平板状の支持体に並んだ物理的に隔てられた複数の空間に充填されている〔1〕の分離方法。

〔3〕分離すべき物質がタンパク質である、〔1〕の分離方法。

〔4〕分離が電気泳動によって行われる〔1〕の分離方法。

〔5〕以下の要素で構成される二次元分離装置。

- a) 一次元目の分離媒体を二次元目の分離媒体と接触した状態に保持する手段
- b) 相互に独立した複数の分離媒体で構成される二次元目の分離媒体、および
- c) 二次元目の分離のための駆動力を供給する手段

〔6〕相互に独立した複数の分離媒体が、平板状の支持体に並んだ物理的に隔てられた複数の空間に充填されている〔5〕の二次元分離装置。

〔7〕二次元目の分離のための駆動力を供給する手段が、分離媒体に電圧を印加する電源である〔5〕の二次元分離装置。

〔8〕相互に独立した複数の分離媒体で構成される二次元分離用媒体。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明を構成する重要な要件は、二次元目の分離を行う分離媒体が相互に独立した複数の分離媒体で構成されていることである。この特徴によって、一定の幅

が求められる二次元目の分離媒体の均質性を高めることができる。なぜならば、ゲルであれ、あるいはそれ以外の媒体にしろ、幅が狭ければ狭いほど、その媒体の中では均質性の高さを維持しやすい。限られた範囲ではあっても均質性の高い状態を確保できるということは、分離されたスポットをより確実に識別できることにつながる。また分離媒体の独立によって、二次元目の分離の結果として得られる各スポットは、少なくとも一次元目の方向に対しては、言うまでも無く必ず明確に分離した状態にある。本発明におけるこの特徴は、分離スポットの座標情報を探るデジタルデータとして捕らえることを可能とする。つまり本発明では、少なくとも一次元方向においてはいくつ目の分離媒体であるのかによって座標情報が規定されることから、これをデジタル化と呼ぶことができる。したがって、本発明においては、一次元目の方向においてはスポットの明確な分離が期待できる。一方、二次元目の展開方向においては、分離媒体の均質性に基づいて、やはりスポットの識別が確実に行われるようになる。座標データの機械的な読み取りにあたっても、高度な画像処理技術を必要とする画像の補正を行わなくても座標の決定が可能となる。こうして、スポットの識別性能が向上し、結果的に分離の再現性の向上をもたらす。本発明によれば、一次元方向におけるデジタル化と、二次元方向におけるスポットの分離能に基づいて、電気泳動像の解析を容易に行えるようになる。

加えて、後に述べるように本発明の他の態様においては、二次元目のみならず一次元目の分離媒体をも複数に分割することも可能である。この態様においては、一次元目と二次元目の両方の展開方向において座標のデジタル化を実現するともできる。

【0013】

以上のような背景から明らかなように、本発明における二次元目の分離媒体には、一次元目の分離媒体の長さ（すなわち分離距離）の少なくとも一部を、更にいくつかに分割した幅を持たせる。分割の数や、個々の分離媒体の幅は特に制限されない。分割する数を増やして個々の分離媒体の幅を小さくすれば、解像度は向上する。しかし、一定の水準を超えると、解像度の向上の程度はわずかとなってしまうことから、解析の目的に応じた解像度となるように経験的に設定するの

が望ましい。たとえば、5000個のスポットが予想されるのであれば、一次元目の分離距離を50~100区画に分けると、理論的には二次元目における一分離媒体あたりのスポットの数が100-50という識別の容易な数となる。なお一次元目の分離距離の全体を二次元目の分離の対象とするとは限らない。たとえば、一次元目の分離の結果の中からある範囲にある物質に着目しているのであれば、その部分の前後のみについて二次元目の分離を実施することもできる。

なお一般に二次元分離方法は、一次元目の分離を行った後にその分離媒体を試料として二次元目の分離を実施する。通常は一次元目の分離操作を完全に独立した分離媒体で行い、分離後に二次元目の分離媒体と接触させる。あるいは、双方の分離結果に影響の無い限り、両者を接触させた状態のまま一次元目の分離を行い、継続して二次元目の分離を行うこともできる。ただし本発明における一次元あるいは二次元の用語は、時間的な順序ではなく、物質の展開方向を意味している。したがって本発明の二次元分離方法には、たとえば後に述べるように、一次元目の分離と二次元目の分離を並行して実施する場合も含まれる。

【0014】

本発明において分離とは、物質が媒体中でなんらかの駆動力によって移動する現象を利用した物理的な分離を意味する。駆動力としては、電圧、遠心力、毛管現象、磁力、電気浸透流、あるいはポンプ送液等を示すことができる。電圧を利用した電気泳動は、二次元電気泳動として広く利用されている駆動原理である。これらの駆動力は、本発明の1次元目の分離にも、二次元目の分離にも利用することができる。また、いずれの駆動原理も任意の順序で組み合わせることが可能である。更に、各駆動力について分離媒体の条件を変更することにより、多様な分離条件を作り出すことができる。以下に、本発明の一次元目、あるいは二次元目の分離に利用することができる条件を具体的に例示する。

【0015】

駆動力として電圧を利用する、いわゆる電気泳動の場合には、たとえば次のような泳動条件を提供することができる。すなわち、pH勾配、分子篩（ふるい）、泳動媒体中で接触する官能基との相互作用等を示すことができる。pH勾配を備えた泳動媒体中における電気泳動をタンパク質に利用すれば、等電点電気泳動

となる。またポリアクリルアミドゲルのような分子篩効果を持つ媒体中で電気泳動を行うとき、SDS、尿素、あるいはグアニジンのようなタンパク質変性剤を共存させれば、変性条件下での分子篩電気泳動が成立する。あるいは、変性剤を用いなければ、ネイティブな条件下での電気泳動となる。更に、さまざまな官能基を備えた泳動媒体の利用も可能である。具体的には、静電的相互作用、水素結合、疎水結合、あるいは任意の組み合わせの親和性物質などを示すことができる。親和性物質としては、抗原－抗体、相補的な塩基配列からなる核酸のハイブリダイゼーション、アビデン－ビオチンや、糖－レクチンのような親和性物質の組み合わせ等がある。電気泳動におけるこれらの泳動条件は、電気泳動以外の駆動力においても応用することができる。

【0016】

いずれの駆動原理を応用するにしても、本発明においては、二次元目の分離は相互に独立した複数の分離媒体によって行われなければならない。本発明において、分離媒体が相互に独立した状態とは、次のように定義することができる。すなわち、二次元目の分離のための駆動力によって、個々の分離媒体の間で分析すべき物質の移動が起きない状態を、相互に独立した状態ということができる。たとえば、二次元目の分離媒体が物理的に遮断されている場合、相互に独立した状態ということができる。より具体的には、ポリアクリルアミドゲルのようなゲルを媒体とするのであれば、相互に遮断された空間内に置かれた複数のストリップ状のゲルを並べて本発明のための二次元分離用媒体とすることができる。たとえば、実施例に示したように板状の支持体に複数の溝を設け、この溝の上に他の板を接着することによって複数の遮断された空間が並列する支持体とすることができる。形成された空間内にゲルを充填すれば、本発明による相互に独立した複数の媒体とすることができます。溝の間隔は必要な解像度が得られるように調整することができる。あるいは、支持体の両面に交互に溝を設け、両面を他の二枚の板で挟みこむように接着すれば、平面的には隙間なく連続したゲルとすることもできる。更には、支持体の両面で部分的に重なるように溝を設けることにより、更に緻密にゲルを並べることもできる。

【0017】

実施例においては分離媒体を、1.5mmの幅を持つストリップ状のゲルとした。しかし本発明の分離媒体の幅は、更に微小なものとすることもできる。たとえば、実施例と同じように支持体に設けた溝に分離媒体を保持させる場合、この溝の幅を $1 - 100 \mu\text{m}$ といった微細な空間とすることもできる。溝の断面は、三角形や四角形のような多角形、あるいはU字型や半円状とすることができる。このような微細な構造の溝をガラス等の支持体に設けるには、次のような方法を利用することができる。

- ・半導体加工技術のウェットエッティング法（フッ酸を使う方法）
- ・半導体加工技術のドライエッティング法（イオンスパッタリング、リアクティブイオンエッティング（ICPエッティングなど））
- ・レーザーせん孔
- ・ダイシングソー（ $10 \mu\text{m}$ 程度の切削が可能）

更に支持体に設けた微細な溝に分離媒体を充填して電気泳動を行う試みは公知である（Science Vol.261, 895-897, 1993）。このような微細な空間内部で電気泳動を行えば、電気浸透流による物質の展開が期待できる。すなわち、キャピラリー電気泳動と同様の原理に基づく分離が可能となるのである。微細なガラス壁で構成された空間内部に通電することにより、ガラス表面の水和した陽イオンが陰極方向へ移動し、巨視的に見ると溶媒が陰極に移動する現象が観察される。この現象が電気浸透(electroosmosis)と呼ばれ、キャピラリー電気泳動における物質の展開のための駆動力として重要な意味を持っている（日本生化学会編・新生化学実験講座「タンパク質I・分離・精製・性質」P340, 1990）。

【0018】

支持体に設けた微細な溝で本発明による分離方法を実施するとき、一次元目の分離媒体を二次元目の分離媒体と同じ支持体上に設けることができる。たとえば、支持体の1辺に一次元分離用の分離媒体を充填するための溝を設ける。更に、この一次元用の溝から分岐する複数の溝を設けて二次元用の分離媒体とする。支持体全体の形状としては任意の形態を取りうるが、泳動像を機械的にスキャンニングするには正方形に近い形とするのが有利である。したがって二次元目の分離媒体は、一次元目の分離媒体から直角に近い角度で分岐するように設計するのが

望ましい。この態様においては分離媒体を収容する個々の溝が微細なため、二次元用の分離媒体としてたとえば幅 $30\mu\text{m}$ の溝100本を $20\mu\text{m}$ 間隔で並べて利用するとしても、並列させるために必要な幅はわずかに 5mm である。すなわち、わずか 5mm 四方の支持体上で二次元分離が可能となる。つまり、本発明によれば、わずか 5mm 四方の大きさの二次元分離用チップが実現する。あるいは、円盤状の支持体の中央部の同心円上に一次元分離用の媒体を配置し、そこから外周に延びる二次元分離用の媒体を設けるという構成も可能である。このような構成からなる二次元分離用チップでは、支持体全体の光学的なスキャンニングを円盤状支持体を回転させることによって容易に、しかも高速に実施することができる。また回転機構を利用して二次元目の分離を遠心分離によって実施することも可能である。

正方形であれ円形であれ、本発明に基づいて集積性を高めた二次元分離用チップを利用すれば、泳動距離が短くなるので泳動時間が短縮され、本発明による再現性の向上も伴って、二次元分離方法のスループットの劇的な向上が期待できる。

【0019】

なお一次元目と二次元目とでは分離媒体の種類が異なることから、まず全体に二次元用の分離媒体を充填した後に、一次元目用の溝の分離媒体を一次元目用のものに置換すればよい。キャピラリー電気泳動は分離媒体として必ずしもゲルを要求せず、液体を分離媒体とすることも可能である。分離媒体が液体の場合には、このようなキャピラリー内部の分離媒体置換操作をマイクロポンプや電気浸透流によって簡単に行うことができる。あるいは一次元目と二次元目とで駆動原理が異なっておれば、全体と同じ媒体としたまでも二次元の分離が可能な場合もある。たとえば一次元目に遠心分離を利用し、二次元目を電気泳動とするような場合には、同一の分離媒体のまま分離を実施できる可能性がある。一次元目の分離を遠心分離に基づいて行う場合、同心円上に複数の本発明による二次元分離用チップをセットして同時に分離を実施することができる。

【0020】

また、複数のキャピラリーをスタックして利用することもできる。複数のキャ

ピラリーを束ねることによって放熱の障害が予想される場合には、隣接するキャピラリーが密着しないように交互に角度をつけて固定するとよい。本発明における二次元用の分離媒体としてキャピラリーを利用した場合には、物質の分離が容易という特徴を生かすことができる。より具体的には、各キャピラリーに物質の採取手段を設け、分離されてくる物質を必要に応じて採取することが可能である。あるいは、目的とする物質の泳動状態をモニターしながら、それが二次元目の分離媒体の末端に達した時点で分離を停止し、目的物質を得ることもできる。この方法によれば、キャピラリーに限らずゲル媒体を利用した場合にも物質の採取を容易に行うことができる。物質の採取を容易に行なうことが可能なのは、本発明の大きな特徴である。

【0021】

本発明の望ましい態様においては、二次元目の分離媒体が单一のスラブゲルではなく独立した複数のゲルで構成される。この特徴を利用して、三次元目の分離が可能である。つまり独立したそれぞれのゲルは、一次元目の分離を行った分離媒体と同様の構造を持っていることから、更に別の分離操作の材料とすることができますのである。したがって、たとえば一次元：等電点電気泳動、二次元：免疫電気泳動に続き、更に三次元：SDS-PAGEといったような特殊な分離手法を可能とする。このような応用は、二次元目の分離を平面で行わざるを得ない公知の方法では事実上は不可能である。

【0022】

駆動力に毛管現象を利用する場合には、ろ紙、ニトロセルロース、あるいは酢酸セルロース等の媒体が用いられる。これらの媒体を相互に独立した状態とすることは、ポリエチレンなどの支持体に固定された媒体を切断したストリップとし、このストリップを間隔をあけて並列させる。ストリップを並列させるときに、支持体どうしを貼り合わせるようにすれば、平面的には隙間なく、かつ相互に独立した状態で複数のストリップを並べることができる。

【0023】

ここまででは二次元目の分離媒体を相互に独立した複数の分離媒体とする場合のバリエーションについて述べた。本発明においては、更に一次元目の分離媒体を

も相互に独立した複数の分離媒体とすることもできる。なおこの態様における一次元目の分離媒体が相互に独立した状態とは、一次元目の媒体のための駆動力によっては、隣接する分離媒体への分析対象物質の展開が起きない状態と定義することができる。たとえば、疎水性基を内壁に固定した溝を一次元用の分離媒体とし、二次元目の分離用媒体としてはアミノ基を固定した溝を利用する。両者を網の目状に交差させてマトリクスを構成する。このとき交差した部分では物質の物理的な移動を許す構造となるようにしておく。ここで一次元方向の溝の一つに着目すると、隣接する溝とは二次元用の分離媒体によって連絡してはいる。しかし二次元目の分離媒体においては、一次元目の分離媒体のための駆動力による物質の移動は生じないと見なせるので、隣接する一次元分離用媒体への物質の移動は起きない状態と言うことができる。この例では、ある一点に試料を供給して毛管現象によって展開すれば、二次元分離を行うことができる。具体的には、一次元方向へは疎水性分子の相互作用による親和性が駆動力となり、一方二次元方向へは逆に親水性分子の相互作用による親和力が駆動力となる。試料を構成する液体（溶媒）そのものは毛管現象によって一次元方向と二次元方向のいずれの方向へも均等に拡散するが、溶質に対しては前記のような駆動力が作用するので二次元分離が成立する。常に一定量の試料を用いるようにしておけば、最終的に毛管現象による拡散が停止したときに、どの座標に物質が展開されているのかを観察することにより物質の分離や同定を行うことができる。

【0024】

本発明では、タンパク質のほかに、核酸等の有機物、細菌やウイルスのような微生物、動植物細胞、あるいは無機イオンなど、各種の分離によって分析することが知られている多くの物質を分析対象とすることができる。これらの分析対象物質の中で、特に二次元電気泳動による解析の意義が大きな物質はタンパク質である。タンパク質の二次元電気泳動は、先に述べたプロテオームの解析において、現在重要な分析手法となっている。本発明をプロテオームの解析に応用するには、以下のような操作を行う。

【0025】

まず、公知の方法によって調製したプロテオームの試料について一次元目の泳

動を行う。タンパク質の二次元泳動分析は、一次元目を等電点電気泳動、二次元目をSDS-PAGEで行うのが一般的である。したがって、ストリップゲルやキャピラリーゲルを媒体として等電点電気泳動する。具体的には、pH勾配を持つ媒体の中心にプロテオーム試料をアプライし、両端を陽極用バッファーと陰極用バッファーとに浸し適当な時間通電して電気泳動する。電気泳動に先立って、プロテオーム試料は蛍光標識しておくことができる。またこのとき、同じ条件で等電点マーカーも泳動しておく。

【0026】

一次元目の泳動の結果得られた泳動媒体を、二次元目のSDS-PAGEのための媒体に接触させる。二次元目用のポリアクリルアミドゲルは、たとえば板状の支持体に溝を設け、これに他の板を接着して構成した空間内でアクリルアミドを重合させることによって相互に独立した状態とすることができます。相互に独立したゲル媒体の一方の開口部に一次元目の泳動媒体を密着させ、その状態でSDS-PAGEを行う。一次元目のゲルに展開されたプロテオームを構成する個々のタンパク質は、相互に独立したゲルのうちそれぞれ最も近い二次元目用のゲルに移動し、分子量にしたがって展開される。分子量マーカーと同じ条件で電気泳動しておく。

【0027】

二次元目の泳動を終えたゲル上で、タンパク質のスポットを確認する。このとき、タンパク質が蛍光標識されていれば、その蛍光を追跡することでこのスポットを確認することができる。この他、CBB染色や銀染色によってタンパク質のスポットを確認することもできる。こうして分離されたタンパク質は、同じ条件で行った二次元電気泳動の結果と比較照合することによって、座標情報に基づいて同定することができる。あるいは未知のプロテオームの解析を進めるには、更に各スポットのタンパク質の同定を進める。

【0028】

タンパク質の同定は、アミノ酸配列解析やペプチドマス・フィンガープリント法に基づいて行われる。アミノ酸配列は、エドマン分解法等の手法によって末端から決定することができる。タンパク質のアミノ酸配列は、この段階で必ずしも全配列を決定する必要はない。部分配列を得るだけでも、タンパク質の同定を可

能とする重要な情報となる。ところでタンパク質にはそのN末端をブロックされているものも多く、配列決定には不都合な状態にある。この種のタンパク質のアミノ酸配列を確実に決定するための手法のひとつに、プロテアーゼによる消化断片を配列決定する方法がある。プロテアーゼによる消化はタンパク質によってまちまちの場所で起きるが、配列決定によってもたらされる部分アミノ酸配列を公知のアミノ酸配列データベースと照合すれば、タンパク質の同定を進めることができる。

【0029】

一方、ペプチドマス・フィンガープリント法は、労働集約的な作業が求められるアミノ酸配列決定に比較して、より迅速にタンパク質同定のための多くの情報を得ることができる。二次元電気泳動の結果として分離されたスポットに含まれるタンパク質を一定のプロテアーゼで消化し、その断片を質量分析装置によって解析することによってプロテアーゼ消化断片の質量のパターン（すなわちフィンガー・プリント）を得る。ペプチドマス・フィンガー・プリントは個々のタンパク質について高度にユニークな情報であり、インターネット上ではそのデータを集積したデータベースProteinProspector(<http://prospector.ucsf.edu/>)等も利用できることから、ペプチドマス・フィンガー・プリントに基づいてタンパク質の同定を行うことができる。

【0030】

プロテオーム解析においては、さまざまな状態にあるプロテオームの二次元電気泳動パターンを比較し、特定の機能に関連するスポットの消長を観察する。特定の状態にある細胞のプロテオームで消失していたり、あるいは逆に特異的に出現するスポットを構成するタンパク質は、着目している機能に関連している可能性が高いと考えられる。そのタンパク質の部分アミノ酸配列やペプチドマス・フィンガー・プリントに基づいて同定が可能であれば、着目している機能との関連性を推測することができる。あるいは、もしも未知のタンパク質であれば、タンパク質の単離やそのタンパク質をコードする遺伝子、更には発現を制御している因子のクローニングを進めることによって、着目している機能を支える遺伝子やタンパク質の働きを解明することができる。

【0031】

本発明は、本発明による二次元分離のための装置をも提供する。本発明の二次元分離装置は、上記要素a) - c) によって構成される。要素a) 一次元目の分離媒体を二次元目の分離媒体と接触した状態に保持する手段とは、一次元目の分離の結果得ることができる物質が一次元方向に展開された媒体を、一次元方向とは異なる方向にそのまま二次元分離することができるよう保持するための手段を意味する。二次元目の分離方向は、通常は一次元方向に対して垂直である。ただし分離方向は結果に影響を与える本質的な要因ではないので、二次元目の分離媒体と一次元目の分離媒体との接触角度は限定されない。二次元目の分離を電気泳動によって行う場合には、一次元目の媒体と二次元目の媒体とが隙間なく接触し、かつ少なくとも一次元目の媒体から二次元目の媒体に分析対象物質のすべてが移動するまでの間、両者の接触を維持することができるものでなければならぬ。

【0032】

続いて要素b) は、先に述べたような相互に独立した二次元目の分離のための媒体からなる。更に要素c) は二次元目の分離のための駆動力を供給するための手段である。すなわち、電気泳動であれば電圧を供給する電源と、泳動媒体を接続するための通電手段、および電極で構成される。遠心力を駆動力とする場合には、必要な g を与える回転装置が要素c) を構成する。

【0033】

本発明の二次元分離のための装置には、特に二次元目の分離媒体を均一な温度条件に維持することができる温度コントローラーを装備するのが望ましい。本発明では複数の泳動媒体を組み合わせることから、分離媒体間の条件を均一に維持することは高い再現性を達成するためには必要な条件である。特に二次元目の分離を電気泳動によって行う場合には、通電による発熱（ジュール熱）が生じることから、分離媒体の温度制御は重要な意味を持つ。温度コントローラーは、分離媒体をサーモスタットを備えたウォーターバスや、あるいは温度制御の可能な閉鎖空間内に分離媒体を置くことによって構成することができる。もっとも、駆動力として、あるいは分離条件において温度が結果を大きく左右しない場合には、

温度コントローラーの重要性は小さくなる。

【0034】

本発明による二次元分離のための装置は、分析対象となる試料や、分子量マーカーのような標準試料を供給する前処理のための機構を備えることもできる。たとえば培養物の中から細胞を分離し、この細胞を破壊してプロテオームを得るステップを機械的に行うための手段を装備すれば、プロテオームの解析を自動化することができる。たとえば白金電極上に形成したアガロース層を備えるフローセルで血液中から細菌を分離し、更に菌体を酵素処理してその核酸成分を抽出する技術が公知である(Heller et.al,Nature Biotechnology 16/6,p541-6,1998)。このような分離技術は、本発明による二次元分離装置の前処理手段として利用することができる。

【0035】

加えて本発明による二次元分離のための装置には、二次元分離の結果を読み取るためのセンサーを装備することができる。分析すべき対象が蛍光標識されたタンパク質の場合、蛍光センサーによって二次元分離媒体をスキャンすることにより、座標情報を機械的に読み取ることができる。あるいは、二次元目の分離のみならず、一次元目の分離を実施し、その分離媒体を二次元目の分離媒体に自動的に供給する手段を組み合わせることもできる。このような機構を備えた本発明による二次元分離装置は、二次元分離に必要なほとんどの工程を自動化することができ、プロテオームの解析効率を飛躍的に高めるものである。

【0036】

【実施例】

【実施例. 1】本発明による二次元電気泳動

1. 分子量マーカー

試料として市販のタンパク質分子量マーカーを用い、本発明による二次元泳動分析を実施した。試料としたのは、Full Range RainbowTM マーカー（分子量マーカー）、およびIEF standards（等電点マーカー）である。各マーカーに含まれるタンパク質の組成を以下に示す。

Full Range RainbowTM マーカー（アマシャム・ファルマシア製）

| 分子量(kDa) | 着色 |
|----------|----|
| 250 | 青 |
| 160 | 赤 |
| 107 | 緑 |
| 77 | 黄 |
| 52 | 紫 |
| 35 | 青 |
| 30 | 橙 |
| 25 | 緑 |
| 15 | 青 |
| 10 | 赤 |

IEF standards (Bio-Rad製)

| タンパク質 | 色 | 等電点 | 分子量 |
|------------|---|------|---------|
| フィコシアニン | 青 | 4.45 | 232,000 |
| (3バンド) | | 4.65 | |
| | | 4.75 | |
| βラクトグロブリンB | | 5.1 | 18,400 |
| ウシ・カルボン酸 | | | |
| アンヒドラーーゼ | | 6.0 | 31,000 |
| ヒト・カルボン酸 | | | |
| アンヒドラーーゼ | | 6.5 | 28,000 |
| ウマ・ミオグロビン | 茶 | 6.8 | 17,500 |
| (2バンド) | | 7.0 | |
| ヒトヘモグロビンA | 赤 | 7.1 | 64,500 |
| ヒトヘモグロビンB | 赤 | 7.5 | 64,500 |
| ヒラマメ・レクチン | | 7.80 | 49,000 |
| (3バンド) | | 8.00 | |
| | | 8.20 | |

サイトクロームC 赤 9.6 12,200

【0037】

2. 二次元泳動用のゲル

本発明に基づいて二次元電気泳動を行うために、相互に独立した複数のポリアクリルアミドゲルで構成される二次元泳動用のゲルを調製した。溝を切ったガラス板に他のガラス板を接着することによって相互に独立した複数の空間を並列して作成し、その中でアクリルアミドを重合化させることで二次元目の泳動用媒体とした。

まず、気泡の無い10cm×10cm×厚さ3mmのガラス板（パイレックスコーニング7740、表面の平坦度は±30μm）に、厚さ300μmのブレード（disco製；DQAQφ634）を付けたダイシングソーで溝（深さ1mm×幅1.5mm）を1.2mm間隔で23本切った。溝を切ったガラス板に感光接着剤Benefixを塗布し、ガラス板（上部に幅8cm×高さ1.5cmの切り欠きがあり、この部分が一次元泳動ゲルを貼り付けるウエルとなる）を重ねて1分間紫外線照射し接着した。

【0038】

以下の組成からなる溶液を調製し、0.2μmのフィルターで脱気後、100μLのN,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を混合して速やかにガラス板内の空間に充填し重合化させた。（）内には最終濃度を示した。

30% アクリルアミドストック溶液 15.8mL(4.75%)

0.75M トリスー塩酸緩衝液(pH8.8) 50mL(0.125M)

10% SDS 1mL(0.1%)

10% 過硫酸アンモニウム(APS) 335μL(0.0335%)

total 100mL

30%アクリルアミドストック溶液：58gのアクリルアミドモノマー、2gのN,N'-メチレンビスアクリルアミドを蒸留水で200mLとしたもの

【0039】

3. 二次元電気泳動

前記分子量マーカーを混合して、市販のプレキャストゲルMultiphor Immobiline DryStrip pH3-10L 70×3×0.5mm（アマシャム・ファルマシア製）を使い等電

点電気泳動を行った。一次元目の泳動を行ったゲルを、2で調製したポリアクリルアミドを充填したガラス板のウエル内に貼り付け、上下方向にSDS-PAGEを行った。泳動条件は、500V(24mA)で15分とした。本発明の二次元電気泳動によって、理論値どおりの場所に各タンパク質のスポットを明瞭に分離しうることが確認された。

【0040】

【実施例. 2】プロテオーム解析

本発明による二次元電気泳動分析がプロテオームの解析にも利用できることを明らかにするために、モデルとして大腸菌のタンパク粗精製物を試料に用い二次元電気泳動を試みた。LB培地で一晩培養した大腸菌を遠心分離によって回収し、菌体を超音波で破碎した。更に遠心分離を行って上清を回収し、大腸菌のタンパク粗精製物とした。この粗精製物（タンパク質濃度約20μg/mL）を、市販の蛍光標識試薬FluoroLink Reactive Dye（アマシャム・ファルマシア製）によって蛍光標識した。標識操作は、商品の指示書に従った。

蛍光標識した大腸菌のタンパク粗精製物を試料とし、実施例. 1と同じ操作にしたがって二次元電気泳動を行った。二次元泳動後のガラス板を、蛍光画像解析装置FluoroImager595（Molecular Dynamics社製）で観察した。励起波長は488nmに固定し、蛍光波長530nmで観察した。得られた泳動像を図1～図3に示す。

【0041】

図1、あるいは、図1の一部を拡大した図2から明らかなように、二次元泳動用のゲルが相互に独立しているので、当然のことながらX軸方向（等電点電気泳動の泳動方向）については、スポットは完全に分離する。また独立した二次元泳動ゲル一つ分を拡大した図3から明らかなように、Y軸方向（SDS-PAGEの泳動方向）については、限られたゲルの幅の中で電気泳動したために、各スポットを明瞭に識別することができる。同様の試料を従来の二次元ゲルで泳動した場合には、各スポットの縁が泳動像の歪みのために識別しにくくなる状態（smiling）が多く観察される。

【0042】

【発明の効果】

本発明によれば、二次元目の分離のための分離媒体を相互に独立した複数の分離媒体で構成するという簡単な構成によって、きわめて明瞭なスポットを得ることができる。本発明をタンパク質の二次元電気泳動に応用すれば、歪みの無いスポットとしてタンパク質を分離することができる。明瞭なスポットは、タンパク質の泳動結果を座標情報として解析する場合であっても、あるいはスポットから同定用試料としてのタンパク質の分離にあたっても、たいへん有利である。

従来の二次元電気泳動では、高度に管理された分析条件下であっても、ゲルの不均質性に起因するある程度のスポットの歪みは避け難い。それに対して、本発明では、特別な注意を払うことなく、再現性に優れる分析結果を達成することができる。この特徴は、膨大な量のタンパク質の解析が必要なプロテオームの解析においてはたいへん重要なことである。複数の研究者、あるいは研究施設間での二次元電気泳動解析結果の共有を効率的に行うには、分析の再現性がたいへん重要な要素となるためである。したがって、本発明によって提供される二次元電気泳動は、プロテオーム解析の有用なツールとして期待できる。

更に、本発明によって二次元目の泳動においてもキャピラリー電気泳動(CE)を利用することが可能となる。CEはマイクロチップ化が容易なため、本発明によつて二次元電気泳動をマイクロチップの上で実施することが可能となる。その結果、二次元電気泳動の処理能力を大幅に向上させるものと考えられる。加えて、CEは物質の採取を行いやすいという特徴を持っており、二次元電気泳動における物質の採取工程の効率化に貢献する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による二次元電気泳動の泳動像を示す写真。図のX軸方向が一次元（等電点電気泳動）の泳動方向、Y軸方向が二次元目（SDS-PAGE）の泳動方向である。

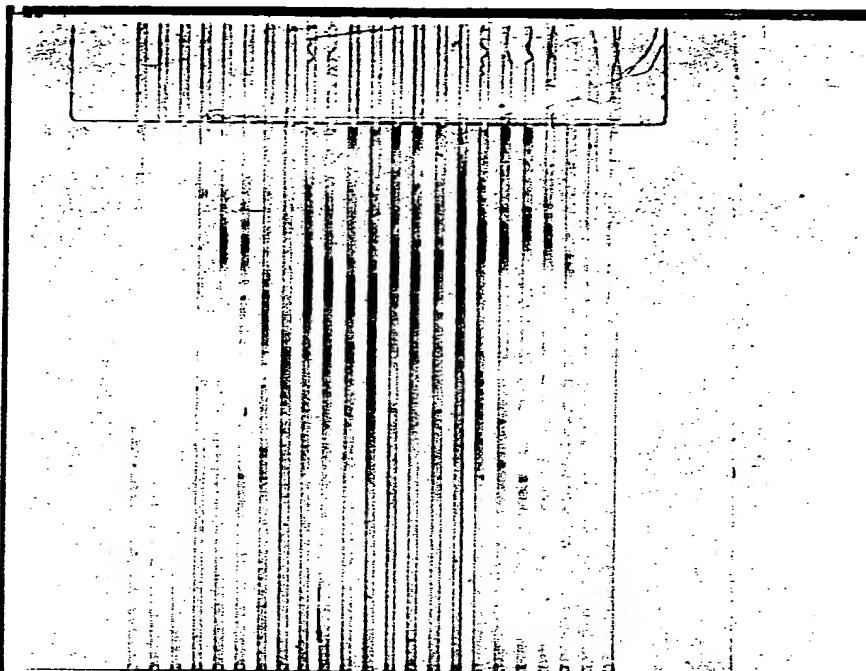
【図2】図1の一部を拡大した写真。

【図3】図1から、独立した泳動媒体を拡大した写真。

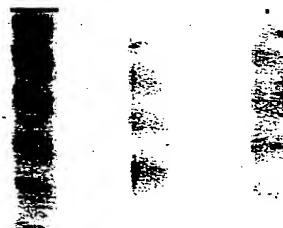
特平 11-0547 8

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



特平11-054708

【図3】

出証特2000-302321

【要約】

【課題】

再現性に優れる二次元分離方法の提供。

【解決手段】

二次元目の分離のための分離媒体が相互に独立した複数の分離媒体で構成されていることを特徴とする二次元分離による物質の分離方法が提供される。分離スポットの歪みの無い、明瞭な分離像を得ることができる。プロテオーム解析のための二次元電気泳動に応用することによって、再現性の著しい向上が期待できる。

【選択図】 図 1

出願人履歴情報

識別番号 [598155287]

1. 変更年月日 1998年10月22日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区神田駿河台3丁目3番地4
氏 名 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター
2. 変更年月日 1999年 7月28日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸ノ内ビルディング6
階
氏 名 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター
3. 変更年月日 1999年12月 1日
[変更理由] 識別番号の統合による抹消
[統合先識別番号] 899000024
住 所 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸ノ内ビルディング6
階
氏 名 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター

出願人履歴情報

識別番号 [899000024]

1. 変更年月日 1999年12月 1日

[変更理由] 識別番号の二重登録による統合

[統合元識別番号] 598155287

住 所 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸の内ビルディング6
階

氏 名 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター